中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 35(4)：504～510 (1986)

臺灣葡萄汁液傳播性黃斑病毒病之發生[1]

楊一郎　鄧汀欽[2]　陳脉紀[3]

摘要：本省田間葡萄呈現黃斑型病徵之病毒病害，於1982年在臺中地區發現。可經汁液接種感染草本檢定植物 *Chenopodium amaranticolor*等13種，形成局部斑點 (local lesion)、黃斑 (yellow spot)、斑紋 (mottling) 及嵌紋 (mosaic) 等病徵。經重複單斑分離，並由其寄主病徵反應及血清反應得到五個分離株。回接到巨峰健全實生苗亦形成黃斑病徵。應用葡萄檢定品種 (*Vitis* indicator)，分別得到嫁接傳播及土壤傳播之分離株，並在檢定葡萄品種上，形成黃斑或葉脈黃化病徵。各病毒之檢定植物病葉材料，經以 grape fanleaf virus (GFLV), tomato ringspot virus (TmRSV), grape Bulgarian latent virus (GBLV) 及grape chrome mosaic virus (GCMV) 四種抗血清之ELISA測定結果，其中兩個分離株與TmRSV抗血清有正反應。經電子顯微鏡觀察結果，在病株粗汁液與組織切片中，發現直徑26—30nm之球型病毒。由以上結果顯示此兩個分離株病毒，為 TmRSV 之系統 (strain) 。

葡萄病毒病害普遍發生於世界各葡萄產地，其種類甚多，已報告者有葡萄扇葉病 (fanleaf)、捲葉病 (leafroll) 及木栓化病 (corky bark) 等20餘種[3,4,5,6,7,8,9,10,18]。葡萄為無性繁殖作物，且大部分由國外引種，致帶毒苗木之擴散蔓延，形成葡萄產業之嚴重損失[3,5,7,9,11]。葡萄病毒病，在不同品種上與不同季節環境下，有不同病徵反應，亦易在高溫季節隱避病徵 (masking) ，且多數為土壤線蟲傳播性病毒[3,5,7,9,10,17]。田間葡萄品種，因病毒病徵隱避或生理病或元素缺乏症之混淆，致不易判別其病徵，故除扇葉病毒羣 (fanleaf group viruses) 為可經由汁液傳染之病毒[3,6,7,9,19]外，其餘病毒皆需賴費時之葡萄屬檢定品種 (*Vitis* indicator plants) 之嫁接檢定[4,7,9,15,17]。本省葡萄病毒病害，尚少有資料可稽[2]。惟各試驗單位之品種圃及各地田間栽培品種，係由國外引進[2]，且有多數品種顯現季節性之疑似病毒病徵[2]。本試驗乃對本省葡萄黃斑型病徵之病毒病材料，所做檢定結果提出報告，藉供研究及防除本省葡萄病毒病之參考，並期提供本省葡萄病毒病之檢疫資料。

材料與方法

汁液接種：

1982年在本省臺中地區主要葡萄產地，調查田間葡萄病毒病，在栽植地區發現多數黃斑型 (yellow mottle) 似病毒病病株。採取其幼葉，加入5倍量之 0.1M phosphate buffer (PH 7.0內含2％ nicotine)，經研磨後，以紗布過濾，以此粗汁液為接種源，並以棉花球棒進行汁液接種在 *Chenopodium amaranticolor*, *Ch.quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Petunia hybrida*, *Datura stramonium*, *Phaseolus vulgaris*, *Nicotiana glutinosa*, *N. rustica*, *N. debneyi*, *N. benthamiana*, *N.*

---

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1307 號，本計畫承農委會資助，謹誌謝忱。
2. 本所植病系副研究員及助理研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。
3. 國立中興大學植病系教授。

tabacum 'Burley 21', *N. tabacum* 'Havana 425', *N. tabacum* 'Van-Hicks', *Lycopersicum esculentum* 'TN1', *Cucumis sativus* 'Pixie' 等15種草本檢定植物 (3.5.6.19) 。在網室內觀察其病徵發展，並進行局部病斑之單斑分離及再接種。另以健全巨峰葡萄果實採取種籽，並以消毒土壤育成健全實生苗。將上述單斑分離後所得之病斑材料，分別以汁液接種法，回接到巨峰健全實生苗。

嫁接及田間土壤傳播試驗：

1982年由美國加州大學Dr. A. C. Goheen引進無病毒葡萄屬檢定植物三品種 (LN-33, Rupestris St. George, Cabernet Franc) 各10支。經以消毒之砼石繁殖，再繁殖在盛有消毒土壤之植缽供試。以上述培育之無病毒葡萄屬檢定植物三品種之芽枝，分別在春季前，嫁接在新社區巨峰葡萄黃斑病株上 (4.7.18) 。另將該葡萄屬檢定品種27苗，分別種植在上述病株間，經兩年觀察其嫁接檢定及病株之土壤傳播結果 (1.7.10.17) 。

血清反應測定：

1983年分別由意大利及美國引進 grape fanleaf virus (GFLV), tomato ringspot virus (TmRSV), grape Bulgarian latent virus (GBLV) 及grape chrome mosaic virus (GCMV) 之抗血清。並以分離得之葡萄5個病毒分離株，分別接種在*N. debneyi*, *N. glutinosa*及*Cucumis sativus*上出現之病葉爲病毒材料，將該病葉加5倍量之phosphate buffer (pH7.0) ，研磨後以紗布過濾之，並以 ELISA方法，重複進行上述材料之測定三次，分析其血清反應結果與病毒類型 (5.6.8.11) 。另以上述病汁液接種於草本植物，供爲純化材料。

電子顯微鏡觀察：

以5個病毒分離株之紅藜局部斑點進行陰染法，另取*N. tabacum* 'Burley 21'上之病斑並以超薄切片法，進行電子顯微鏡 (JEOL-200CX型) 觀察，檢查病毒型態、大小、存在情形及分析該病毒類型 (.6.7.9.10.11) 。

耐稀釋度測定：

以上述5個病毒分離株之*N. debneyi*病葉，加10倍量phosphate buffer (pH 7.0) 研磨，以紗布過濾其粗汁液後，分別以其10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}，10^{-4}，10^{-5}及10^{-6}之稀釋汁液，接種在檢定植物*Ch. amaranticolor*及 *N. debneyi*，定期記錄各病徵反應，藉以明瞭各病毒分離株之耐稀釋度 (dilution end-point) ，本試驗重複三次。

結果及討論

汁液接種：

供試田間葡萄黃斑病葉 (圖A) ，經供試15種草本檢定植物之汁液接種及單斑分離接種試驗結果，分別呈現局部斑點、系統性斑紋、黃斑、嵌紋等病徵及部分無感染反應。依其在寄主植物上之反應及病徵型而分爲五個類型之病毒分離株。各分離株，分別回接到健全巨峰實生苗亦呈現黃斑型病徵。結果如表1。

依上述試驗結果，證實本省田間巨峰葡萄黃斑型病株，係汁液傳播性病毒。可使*Ch. amaranticolor*等3種植物呈現局部壞疽斑點 (圖B及C) 。菸草、胡瓜及番茄等10種植物，形成斑紋、黃斑或嵌紋等系統性病徵 (圖D、E、F及G) ，2種植物無感染反應。上述草本植物中，經血清反應測知，G614分離株在千日紅及 *N. benthamiana* 之病毒濃度最高，可供爲純化材料。

嫁接及田間土壤傳播試驗：

田間病株，經嫁接傳播試驗結果，在供試葡萄屬檢定品種接穗上顯現黃斑型病徵 (4,7,18) 。巨峰葡萄發病田之田間土壤傳播試驗結果，在觀察2年間，葡萄屬檢定品種27株中，有7株顯現葉脉黃化病徵 (5,7,10,17) 。由於大多數葡萄病毒，係經由土壤線蟲媒介傳播 (3,5,7,9,10,17) ，及根據本省葡萄線蟲調查報告 (1) ，並由本試驗之土壤傳播結果，推測本病毒似經由病田土壤中存在之 *Xiphinema* spp. 線蟲

表1. 葡萄黃斑病毒經汁液接種在草本檢定植物之病徵反應。

Table 1. Symptom responses of herbaceous indicator plants to virus isolates of grape yellow mottle by sap inoculation.

Indicator plants	Inocula				
	G608	G612	G614	G615	G675
Chenopodium amaranticolor	LL*	LL	LL	LL	LL
Ch. quinoa	LL	LL	LL	LL	LL
Gomphrena globosa	NL	NL	NL, Mt	NL	NL
Nicotiana glutinosa	—	—	Mt	Mt	Mt
N. tabacum 'Burley 21'	—	—	M, YS	M	M
N. tabacum 'Van-Hicks'	—	—	M	M	RS
N. tabacum 'Havana 425'	—	—	YS	YS	YS
N. debneyi	Mt	Mt	Mt	Mt, M	Mt
N. rustica	—	—	—	—	—
N. benthamiana	—	—	Mt	Mt	M
Phaseolus vulgaris	—	—	M, Mt	M	—
Cucumis sativus 'Pixie'	—	M	M	M	M
Datura stramonium	—	—	—	—	—
Petunia hybrida	—	—	VC	VC	VC
Lycopersicum esculentum 'TN1'	M	—	M	M	M

*LL : local lesion. NL : necrotic lesion. Mt : mottling. M : mosaic. YS : yellow spot. VC : vein clearing. — : none

媒介傳染(1,7,10,17)。

血清反應測定：

以上述葡萄黃斑病之5個分離株與四種抗血清（GFLV, TmRSV, GBLV, GCMV）之ELISA血清反應試驗結果如表2。

表2. 葡萄病毒各病毒分離株及健全植物材料與GFLV, TmRSV, GBLV及GCMV抗血清之ELISA反應。

Table 2. ELISA reaction of virus isolates of grape yellow mottle to antisera against GFLV, TmRSV, GBLV and GCMV.

Preparations	Antisera*			
	GFLV	TmRSV	GBLV	GCMV
G608	—**	—	—	—
G612	—	—	—	—
G614	—	+	—	—
G615	—	+	—	—
G675	—	—	—	—
Healthy				
Cucumis sativus	—	—	—	—
Nicotiana debneyi	—	—	—	—
N. glutinosa	—	—	—	—

* Antisera against grape fanleaf virus (GFLV), tomato ringspot virus (TmRSV), grape Bulgariun latent virus (GBLV) and grape chrome mosaic virus (GCMV).

**— ; negative reaction. + : positive reaction

依上述結果，供試5個病毒分離株中之 G614 及G615與TmRSV抗血清有正反應（表2），可知該兩個病毒分離株與TmRSV有關 (5,6,8,11,17)。上述G614病毒分離株，業經以 *N. benthamiana* 大量繁殖，供為該病毒之純化材料，並已純化該病毒。以該純化之病毒為抗原，已製成G614分離株之抗血清。又其他三個病毒分離株尚待檢定探討。

電子顯微鏡觀察：

供試5個病毒分離株，接種在草本檢定植物所得局部斑點及系統性病徵葉片，分別經陰染法及超薄切片法之電子顯微鏡觀察結果，皆觀察到分散或成堆集狀之球型病毒顆粒，直徑為 26—30nm。此項結果與已報告之葡萄汁液傳播性病毒型態近似 (3,5,6,7,8,9,10,11)。上述材料中 G614及G615分離株之病毒型態及大小（圖H及I）與已報告之 TmRSV 相近似 (17)。

耐稀釋度測定：

供試葡萄5個病毒分離株病葉粗汁液之耐稀釋度，測定結果如表3。

表3. 葡萄黃斑病毒之耐稀釋度測定

Table 3. Dilution end-point assay of different virus isolates of grape yellow mottle.

preparation dilution	Virus isolates				
	G608	G612	G614	G615	G675
10^{-1}	+*	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	−	+	−
10^{-4}	+	+	−	−	−
10^{-5}	+	+	−	−	−
10^{-6}	−	−	−	−	−

*Infectivity of several preparations.

依上述結果，供試5個病毒分離株之耐稀釋度有差異，其中 G614 及G615之耐稀釋度分別為10^{-2}～10^{-3}與10^{-3}～10^{-4}，而與已報告之TmRSV相近似 (17)。

由上述各項試驗結果顯示，本省田間葡萄黃斑病為汁液傳播性葡萄病毒所引起。經分離得到5個病毒分離株，其中之2個分離株（G614及G615）為與TmRSV有關之葡萄病毒系統 (5,6,8,13,16,17)。另其餘3個病毒分離株，究屬何種類型之葡萄病毒，尚待研究證實。本報告首次證實本省汁液傳播性葡萄病毒之存在 (2)。葡萄病毒種類甚多，因隱避病徵之潛伏病毒、各國間之引種、無性繁殖之插枝、嫁接及土壤線蟲之傳播，導致病毒之擴散與複合感染，有些迄未確定其病原，又多數需經葡萄屬檢定品種嫁接檢定，致費時且效果不明確 (2,3,4,5,7,9,11,13,15,18,19)。本省葡萄病毒之檢定與研究歷史甚短，年來由國外引進多量苗木，為防止病毒之蔓延，對檢疫制度之建立、檢定研究工作之强化及病毒抗血清之製作等，有待有關單位之合作與加速進行。

誌　　謝

本報告承農委會資助，並承邱人璋博士、蘇鴻基博士、難波成任博士、Dr. A. C. Goheen, Dr. D. Gonsalves，Dr. G. Martelli, 王雙明、廖富爾及陳慧璘之分別提供材料與協助指教，許秀惠、王為一、吳瑜卿及鄭錫琴之協助，一併致謝。

參考文獻

1. 林奕耀、蔡東纂・1984・臺灣地區葡萄園中植物寄生性線蟲相之調查。中國園藝，30，173—179。
2. 陳慧璘、曾德賜、陳脉紀・1981・臺灣葡萄黃化萎縮病（新毒素病）之初步研究。科學月刊，9，584—591。
3. Cadman, C. H., H. F. Dias and B. D. Harrison. 1960. Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevines in Europe and Noth America. Nature, 187, 577-579.
4. Converse, R. H. 1972. Recommended virus-indexing procedures for new USDA small fruit and grape cultivars. Plant Dis. Reptr., 63, 848-851.
5. Gilmer, R. M., J. K. Uyemoto and L. J. Kelts. 1970. A new grapevine disease indued tobacco ring spot virus. Phytopathology, 60, 60, 619-627.
6. Gonsalves, D. 1979. Deteetion of tomato ringspot virus in grapevines: a comparison of *Chenopodium quinoa* and enzyme-linkedi mmunosorbent assay (ELISA). Plant Dis. Reptr., 63, 962-965.
7. Goheen, A. C. 1977. Virus and viruslike diseases of grapes. Hort. Science, 12, 465-469.
8. Gooding, G. V. 1963. Purification and serology of a virus associated with the grape yellow vein disease. Phytopathology, 53, 475-480.
9. Hewitt, W. B. 1968. Viruses and virus diseases of the grapevine. Rev. Appl. Mycol. 47, 433-455.
10. Hewitt, W. B., G. Martelli, H. F. Dias and R. H. Taylor. 1970. Grapevine fanleaf virus. C. M. I./A A. B. Descriptions of Plant Viruses, No. 28.
11. Kearns, C, G. 1984. Detection of nepoviruses of *Vitis vinifera* in New Zealand using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). New Zealand J. Agri. Res., 27, 431-435.
12. Luft, J. H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem, Cytol.*, 9, 409-414.
13. McClean, D. M. 1962. Differentiation of tobacco ringspot and tomato ringspot viruses by experimental host reactions. Plant Dis. Reptr., 46, 877-881.
14. Milloning, G. 1961. A modified procedure for lead staining of thin section. *J. Biophys. Biochem, Cytol.*, 11, 736-739.
15. Mink, G. L., and J. L. Parsons. 1975. Rapid indexing procedures for detecting yellow speckle disease in grapevine. Plant Dis. Reptr., 59, 869-872.
16. Stace-Smith, R. 1966. Purification and properities of tomato ringspot virus an RNA-deficient component, Virology, 29, 240-247.
17. Stace-Smith. R. 1970. Tomato ringspot virus. C. M. I./A. A. B. Descriptions of Plant Virus, No. 18
18. Tanaka, S. 1976. Indexing grapes in Japan for viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan, 42, 192-196.
19. Uyemoto, J. K., A. C. Goheen, C. F. Luhn and L. J. Peterson. 1976. Use of *Chenopodium quinoa* in indexing for grapevine fanleaf virus. Plant Dis. Reptr., 60, 536-538.

圖 版 說 明：

Explanation of plates :

圖A. 巨峰葡萄田病株葉片呈現黃斑病徵。
Fig. A. Yellow mottling symptoms in grape leaf found in Kyoho vineyards.

圖B. 葡萄黃斑病之汁液接種，在紅藜呈現局部斑點病徵。
Fig. B. Local lesions symptoms in *Ch. amaranticolor* caused by virus of grape yellow mottle with sap inoculation.

圖C. 白藜呈現之局部斑點病徵。
Fig. C. Local lesons symptoms in *Ch. quinoa.*

圖D. *N. glutinosa*呈現斑紋與嵌紋病徵。
Fig. D. Mottling and pattern mosaic symptoms in *N. glutinosa.*

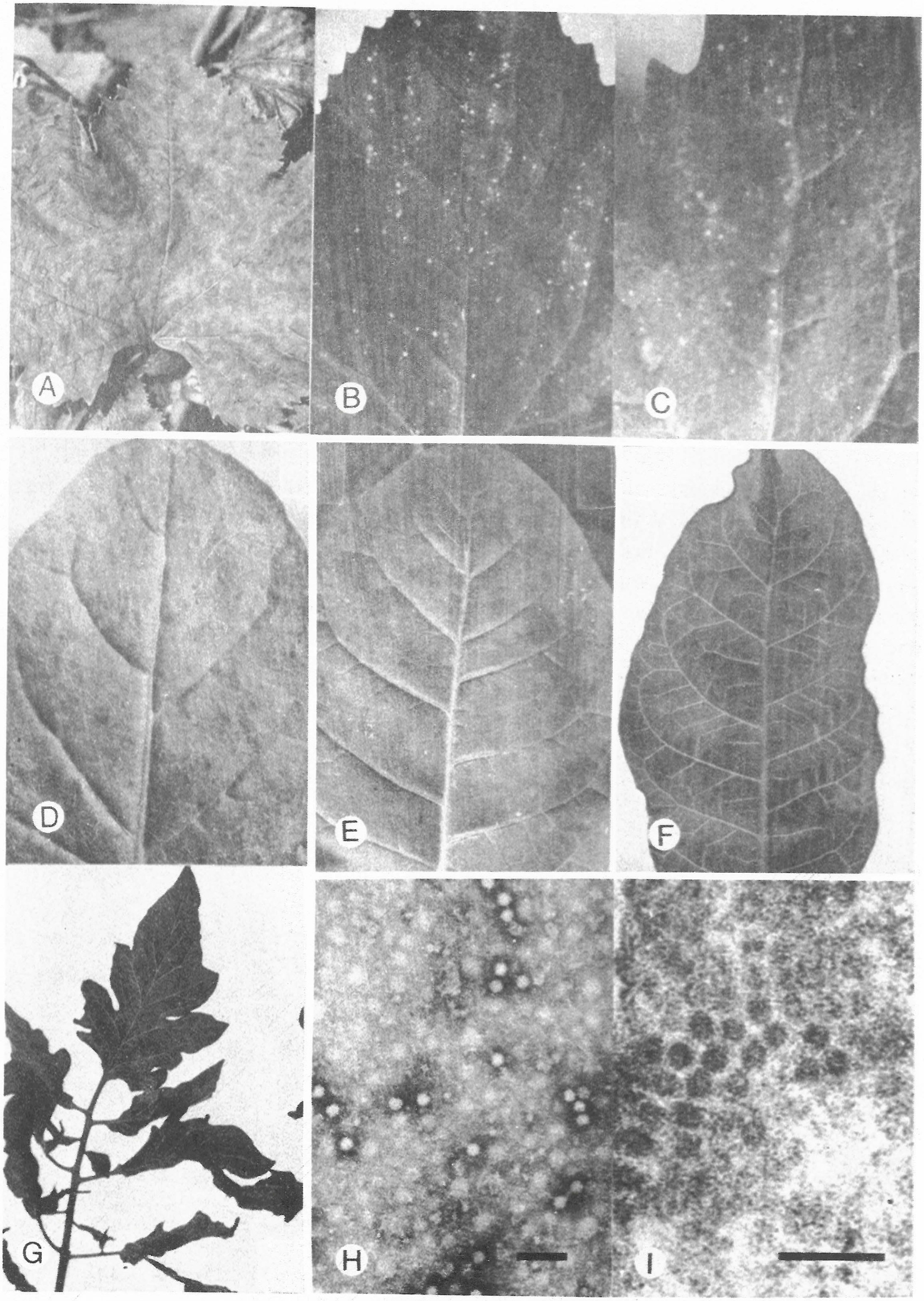
圖E. *N. tabacum* 'Burley 21'呈現斑紋與黃斑病徵。
Fig. E. Mottling and yellow spot symptoms in *N. tabacum* 'Burley 21'.

圖F. *N. debneyi*呈現斑紋與脈斑病徵。
Fig. F. Mottling and pattern veinbanding symptoms in *N. debneyi.*

圖G. 番茄（臺農1號）呈現嵌紋及扇葉病徵。
Fig. G. Mosaic and fanleaf symptoms in *Lycopersicum esculentum* 'TN1'.

圖H. 紅藜局部斑點病斑之陰染法電子顯微鏡觀察到病毒顆粒。
Fig. H. Negatively stained virus particles from the local lesions of *Ch. amaranticolor*. Bar represents 100nm.

圖I. *N. tabacum* 'Burley 21'黃斑之超薄切片法電子顯微鏡觀察到病毒顆粒。
Fig. I. Virus particles in the cytoplasm of infecetd *N. tabacum* 'Burley 21' cell. Bar represents 100nm.


A
B
C
D
E
F
G
H
I

Sap-transmissible Viruses Associated with Grapevine Yellow Mottle Disease in Taiwan[1]

I-lang Yang, Ting-ching Deng[2] and Moh-jih Chen[3]

Summary

Some virus-like disorder showing yellow mottle or yellow vein or mosaic symptoms were found in some vineyards in Taichung areas in 1982. These diseases were transmitted to 13 species of herbaceous plants by sap inoculation, and showed either local lesion or yellow spot or mosaic symptoms. Five virus isolates were isolated from different single lesions according to different host reactions and symptomatology. Back inoculation to healthy grape seedlings were succeeded by mechanical transmission. Graft indexings were succeeded by use of healthy *Vitis* indicators, and were also confirmed as a soil-borne virus disease. Two isolates showed positive reaction to antiserum against tomato ringspot virus. Electron microscopy found spherical virus particles, 26 to 30nm in diameter in either infected leaf extract or tissue section. Accordingly, two virus isolates of these grape yellow mottle were confirmed as relative to one strain of tomato ringspot virus.

---

1. Contribution No. 1307 from the Taiwan Agricultural Research Institute. This project was granted by the Council of Agriculture, ROC.
2. Plant pathologists, Department of Plant Pathology, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan , ROC.
3. Professor, Department of Plant Pathology, NCHU, Taichung, Taiwan, ROC.